

# **POLYPEPTIDE HAVING PTHrP ANTAGONISTIC ACTIVITY AND THERAPEUTIC AGENT FOR CALCIUM METABOLISM CONTAINING THE SAME**

Patent Number: JP7165790  
Publication date: 1995-06-27  
Inventor(s): YANAIHARA NOBORU; others: 04  
Applicant(s):: TONEN CORP  
Requested Patent: ☐ JP7165790  
Application Number: JP19930268311 19930930  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07K7/04  
EC Classification:  
Equivalents:

## **Abstract**

**PURPOSE:**To obtain a human parathyroid hormone related protein (PTHrP) antagonist having higher antagonistic activities than those of a well-known PTHrP antagonist.  
**CONSTITUTION:**This PTHrP antagonist is a polypeptide, having activities in antagonizing physiological actions of a human PTHrP or a polypeptide having the activities of the human PTHrP without any human PTHrP activities and containing an amino acid sequence expressed by the following formulas [I] to [III]: L e u H  
isAsnLeuDTpLysSerIleGlnAspLeuArgArgArgPhePheLeuHisHisLeulleAlaGlulleHisThrAla...[I],  
LeuHisAsnLeuD-Phe (4-F)LysSerIleGlnAspLeuArgArgArgPhePheLeuHisHisLeulleAlaGlu  
lleHisThrAla...[II] and LeuHisAsnLeuD-TrpLysSerIleGlnAspLeuArgArgArgPhe  
PheLeuHisHisLeulleAlaGlulleHisThr...[III].

Data supplied from the esp@cenet database - 12



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07165790 A**(43) Date of publication of application: **27.06.95**

(51) Int. Cl.

**C07K 7/04**(21) Application number: **05268311**(22) Date of filing: **30.09.93**(71) Applicant: **TONEN CORP**

(72) Inventor: **YANAIHARA NOBORU**  
**YAMAGUCHI KEN**  
**NAGASAKI KOICHI**  
**OUÉ CHIHARU**  
**MATSUZAKI JUNICHI**

(54) **POLYPEPTIDE HAVING PTHRP ANTAGONISTIC  
 ACTIVITY AND THERAPEUTIC AGENT FOR  
 CALCIUM METABOLISM CONTAINING THE  
 SAME**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a human parathyroid hormone related protein (PTHrP) antagonist having higher antagonistic activities than those of a well-known PTHrP antagonist.

**CONSTITUTION:** This PTHrP antagonist is a polypeptide, having activities in antagonizing physiological actions of a human PTHrP or a polypeptide having the activities of the human PTHrP without any human PTHrP activities and containing an amino acid sequence expressed by the following formulas [I] to [III]: L e u H

isAsnLeuDTrpLysSerIleGlnAspLeuArgArgArgPhePheLeu  
 HisHisLeulleAlaGluIleHisThrAla...[I], LeuHisAsnLeuD-Phe  
 (4-F)LysSerIleGlnAspLeuArgArgAr  
 gPhePheLeuHisHisLeulleAlaGlu IleHisThrAla...[II] and  
 LeuHisAsnLeuD-TrpLysSerIleGlnAspLeuArgArgArgPhe  
 PheLeuHisHisLeulleAlaGluIleHisThr...[III].

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-165790

(43) 公開日 平成7年(1995)6月27日

(51) IntCl.<sup>6</sup>  
C 0 7 K 7/04識別記号 庁内整理番号  
8318-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-268311

(22) 出願日 平成5年(1993)9月30日

(71) 出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(72) 発明者 矢内原 昇

静岡県静岡市谷田52-1 静岡県立大学薬学部内

(72) 発明者 山口 建

東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所内

(72) 発明者 長崎 光一

東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所内

(74) 代理人 弁理士 久保田 耕平 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTHrPアンタゴニスト活性を有するポリペプチド及びそれを含むカルシウム代謝治療薬

(57) 【要約】

【目的】 公知のPTHrPアンタゴニストよりもアンタゴニスト活性が高いヒトPTHrPアンタゴニストを提供すること。

【構成】 ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式[I]ないし[VI]のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg  
Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His  
Thr Ala [I]Leu His Asn Leu D-Phe(4-F) Lys Ser Ile Gln Asp Leu  
Arg Arg Arg Phe PheLeu His His Leu Ile Ala Glu Ile  
His Thr Ala [II]Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg  
Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His  
Thr [III]

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式[I]で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg  
Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His  
Thr Ala [I]

【請求項2】 ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式[II]で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

Leu His Asn Leu D-Phe(4-F) Lys Ser Ile Gln Asp Leu  
Arg Arg Arg Phe PheLeu His His Leu Ile Ala Glu Il  
e His Thr Ala [II]

【請求項3】 ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式[III]で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg  
Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His  
Thr [III]

【請求項4】 上記式[I]ないし[III]のいずれかで表されるポリペプチド。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分として含有するヒトPTHrPに対するカルシウム代謝治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、PTHrPアンタゴニスト活性を有するポリペプチド及びそれを含むカルシウム代謝治療薬に関する。本発明のアンタゴニストは、高カルシウム血症等の治療に用いられる。

## 【0002】

【従来の技術】血液中のカルシウム代謝調節因子として代表的なものには副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)、カルシトニン、ビタミンD等があるが、癌が引き起こす高カルシウム血症の原因物質としては、上記のいずれでもないことが指摘されていた。1987年になりMoseleyらにより高カルシウム血症を呈したヒト扁平上皮癌より、PTHと同じ活性を示すタンパク質が単離され、これは副甲状腺ホルモン関連タンパク質(parathyroid hormone related protein, PTHrP)と命名された。また、癌患者における高カルシウム血症の原因物質がこのPTHrPであることも判明した。

【0003】さらに、Suvaらにより、PTHrPのアミノ酸配列及びcDNA塩基配列が決定されるに至り、PTHrPは141アミノ酸より成るものであることがわかった。Suvaらは、得られたcDNAより哺乳類の細胞系でPTHrPを発現させ、PTH活性換算48μg/

1の発現を確認している。

【0004】Rodanらは既にヒトPTHrPのN末端側から1〜34番目のペプチドフラグメント(以下、「ヒトPTHrP(1-34)」という)を化学的に合成し、ラット骨肉腫由来の細胞株ROS17/2.8におけるアデニレートシクラーゼの活性の増加に関してヒトPTH(1-34)と同様の活性を持つことを確認している。

【0005】癌患者における高カルシウム血症は、癌患者全体の約10%に発症するとされ、血中のカルシウム濃度の上昇により疼痛等様々な障害を引き起こすものである。

【0006】現在、この高カルシウム血症の治療薬として、カルシトニン関連ペプチドがあるが、その効果は一過性のものであり有効率も低い。これは、カルシトニンは破骨細胞のレセプターに結合し、骨吸収の抑制作用を示すが、高カルシウム血症の原因物質であるPTHrPの活性を抑えるわけではないためであり、従って、その効果にも限界がある。

【0007】本出願人は、先に、PTHrPのN末端側から1〜6番目のアミノ酸配列がPTHrP活性の発現に必須的であること及び7〜34番目のアミノ酸配列によりPTHrPレセプターに結合し得ることを見出し、従って、PTHrPのN末端側から7〜34番目のアミノ酸配列(以下、「ヒトPTHrP(7-34)」はPTHrPのアンタゴニストとして有用であることを見出し特許出願した(特開平2-207099号)。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記した特開平2-207099号公報に記載されたPTHrPアンタゴニストは、PTHrP活性を有さず、PTHrPと競合的にPTHrPレセプターに結合することによりPTHrP活性を拮抗する。もし、この公知のPTHrPアンタゴニストよりもアンタゴニスト活性が高いPTHrPアンタゴニストが得られれば、高カルシウム血症の治療により有効である。

【0009】従って、本発明の目的は、上記公知のPTHrPアンタゴニストよりもアンタゴニスト活性が高いヒトPTHrPアンタゴニストを提供することである。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、ヒトPTHrP(7-34)中の数個のアミノ酸を置換することにより、そのアンタゴニスト活性が有意に高まることを見出し本発明を完成した。

【0011】すなわち、本発明は、ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式[I]で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg  
Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His

Thr Ala [I]

【0012】また、本発明は、ヒトPTHrP活性を有せず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式 [II] で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

Leu His Asn Leu D-Phe(4-F) Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe PheLeu His His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala [II]

【0013】さらに本発明は、ヒトPTHrP活性を有せず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有し、下記式 [III] で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

Leu His Asn Leu D-Trp Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe LeuHis His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr [III]

【0014】さらに本発明は、上記式 [I] ないし [II] のいずれかで表されるポリペプチドを提供する。

【0015】さらに本発明は、上記本発明のいずれかのポリペプチドを有効成分として含有するヒトPTHrPに対するカルシウム代謝治療薬を提供する。

【0016】以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】上記式 [I] ないし [III] は、N末端側から記載されている。上記式 [II] 中のD-Phe(4-F)は、フェニルアラニンのD体中のフェニル基の4位がフッ素原子に置換したものを意味する。また、上記式中、D-TrpはトリプトファンD体を意味する。その他、D、Lの表示のないアミノ酸はL体である。なお、ポリペプチドを化学合成する都合上、N末端のロイシンが脱アミノされてデスアミノロイシンとなり、C末端のアラニン(式 [III] ではスレオニン)のカルボキシル基にNH<sub>2</sub>が結合されたものとなることがあるが、後述の実施例で明らかになるように、これらもPTHrPアンタゴニスト活性を有するものであり、上記各式で表されるポリペプチドは、N末端が脱アミノされ、C末端がアミノ化されたポリペプチドをも包含する。

【0018】上記式 [I] ないし [III] で示される各ポリペプチドは、ヒトPTHrPのN末端側から8～34番目(式 [III] は8～33番目)のアミノ酸配列から成るポリペプチド中の数個のアミノ酸を置換したものである。この置換により、後述の実施例において明らかになるように、驚くべきことに、アデニレートシクラーゼ阻害活性、すなわち、ヒトPTHrPアンタゴニスト活性が有意に高められた。

【0019】本発明のポリペプチドは、上記式 [I] ないし [III] で表されるアミノ酸のみから成るものであってもよいし、ヒトPTHrP活性を発揮しない限り、これにさらに他のアミノ酸配列が加わったものでもよい。例えば、ヒトPTHrPの35番目以降(式 [III] では

34番目以降)のアミノ酸がC末端に結合したものであってもよい。

【0020】本発明のポリペプチドは化学合成又は遺伝子工学的手法により製造することができる。アミノ酸の数が40以下の場合には化学合成により製造する方法が便利であるが、アミノ酸の数が40を超えると化学合成が困難になるので遺伝子工学的手法により合成することが好ましい。

【0021】上記各式で表されるポリペプチドは、アミノ酸の数が26個又は27個であるので、市販のペプチド合成機を用いて容易に調製することができる。例えば、アプライドバイオシステムズ社のモデル430ペプチドシンセサイザーを用いてFmoc法により行うことができる。

【0022】遺伝子工学的手法による本発明のポリペプチドの合成は、ポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上記ポリペプチドを回収することにより行うことができる。

【0023】上記発現ベクターにおいて、本発明のポリペプチドをコードする領域は、本発明のポリペプチドをコードするものであればいかなる塩基配列を有していてもよいが、発現がスムーズになるよう大腸菌の使用頻度の高いコドンを使い、パリンδροームや相同配列を避けることが望ましい。

【0024】上記本発明のポリペプチドコード領域の上流には大腸菌内での転写効率を高めるプロモーターが存在する。プロモーターは大腸菌由来のものが好ましく、特にトリプトファンプロモーターが好ましい。プロモーターの直下流に本発明のポリペプチドコード領域が位置していてもよいが、大腸菌trpEタンパク質のような、大腸菌由来タンパク質をコードする領域の下流に上記領域が位置していてもよい。後者の場合には、本発明のポリペプチドは融合タンパク質の形態として得られる。

【0025】用いられるベクターは、抗生物質耐性のような適当な選択マーカー及び大腸菌内で複製するための複製開始点を有する。さらに、上記本発明のポリペプチドコード領域の下流には転写終結コドンが存在する。例えばpUC9、pBR322その他の市販の大腸菌用ベクターをそのまま利用することができる。

【0026】発現ベクターは、上記した本発明のポリペプチドコード領域を例えばホスホアミダイド法等の公知の方法により合成し、これを大腸菌用の市販のベクター又は大腸菌内で発現する公知のベクターにクローニングすることにより作製することができる。得られた発現ベクターを用いた形質転換及びその後の大腸菌の培養は周知の方法により行うことができる。形質転換された大腸菌により産生された本発明のポリペプチドは、菌体を遠心分離等で集め、周知のリゾチーム処理及び/又は超音

波処理等で菌体を破壊し、これを周知の方法に基づきゲルろ過クロマトグラフィー等にかけることにより分離精製することができる。

【0027】本発明のカルシウム代謝治療薬は、上記本発明のポリペプチドを有効成分とするものである。本発明のカルシウム代謝治療薬のヒトに対する投与量は、通常、本発明のポリペプチドの量で  $3 \times 10^{-6}$  モルないし  $3 \times 10^{-7}$  モル程度であり、投与経路は静脈注射又は筋肉内注射が好ましい。また、カルシウム代謝治療薬としての具体的な製剤例として、生理食塩水又はクエン酸緩衝液中に本発明のポリペプチドを  $1 \times 10^{-6}$  M ないし  $1 \times 10^{-7}$  M 含むものを挙げるることができる。

【0028】本発明のカルシウム代謝治療薬は、カルシウム代謝に異常のある種々の疾病、例えば高カルシウム血症、骨粗鬆症のような骨疾患及び慢性腎不全による高カルシウム血症の治療に用いることができる。

\*

## \* 【0029】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき、さらに具体的に説明する。

## 【0030】実施例1 ポリペプチドの合成

アプライドバイオシステムズ社製モデル430ペプチドシンセサイザーにより、上記式 [I] ないし [III] で表されるポリペプチドを合成した。ただし、N末端のロイシンは脱アミノしたデスアミノロイシンであり、N末端のアラニン（式 [III] のものではスレオニン）のカルボキシル基にはアミノ基が結合したものが得られた。合成された各ポリペプチドのアミノ酸分析の結果をその理論値とともに下記表1に示す。また、各ポリペプチドのHPLCにおける滞留時間とFAB-MSの結果を表2に示す。

## 【0031】

## 【表1】

表1 合成ペプチドアミノ酸分析

ペプチド		Asx	Thr	Ser	Glx	Ala	Ile	Leu	Phe	Lys	Hls	Arg
I	実測値	2.03	0.96	0.91	2.16	1.99	2.90	4.14	2.02	0.98	3.93	2.98
	理論値	2	1	1	2	2	3	4	2	1	4	3
II	実測値	2.01	0.93	0.97	2.17	1.99	2.87	4.11	2.08	0.89	3.89	2.99
	理論値	2	1	1	2	2	3	4	2	1	4	3
III	実測値	1.82	1.09	0.93	2.09	1.14	2.88	4.13	2.22	0.88	4.02	2.95
	理論値	2	1	1	2	1	3	4	2	1	4	3

## 【0032】

## 【表2】

表2 合成ペプチドのHPLCおよびFAB-MSデータ

ペプチド	分析HPLC	FAB-MAS	
	R T (min)	実測値	理論値
I	24.6	3462	3461
II	22.2	3328	3327
III	20.1	3278	3277

【0033】実施例2 ポリペプチドのアンタゴニスト  
活性（生体外試験）

※実施例1で合成した各ポリペプチドのアンタゴニスト活性を、ラット骨髄腫細胞株ROS17/2.8を用い、*in vitro*

で試験した。試験方法は、具体的には次のように行った。ROS細胞に対して、最大刺激近くまで充分cAMP産生能が得られた $5 \times 10^{-7}$ MのPTHrP(1-34)の刺激に対する抑制効果を、各種ポリペプチドを段階的に希釈して、比較した。ROS17/2.8をHam's F12培地で2日間培養した。F12培地で細胞を洗った後、濃度を変えた合成ポリペプチドとPTHrP(1-34)を加え、37℃、10分間インキュベートした。氷上、1NHC1を加えた後、細胞を集め、上清を市販(ヤマサ社製)のcAMP RIAのキットで濃度を測定した。なお、ポリペプチド(I-III)単独で加えた場合、cAMPの上昇(アゴニスト活性)は認められなかった。

【0034】結果を図1に示す。この図から明らかなように、本発明のポリペプチドは、公知のヒトPTHrP(7-34)に比べ、アデニレートシクラーゼ活性の阻害率が有意に高く、ヒトPTHrPアンタゴニストとしてより優れていることが明らかになった。

【0035】**実施例3** ポリペプチドのアンタゴニスト活性(生体内試験)

1群4匹のマウスに1日当たり250 pmolのヒトPTHrP(1-34)を投与し、これと同時に1日当たり500 nmolの実施例1で合成した式[I]で表されるポリペプチドを投与した。これらの投与経路は皮下に連続投与(オスモテックミニポンプ)であり、担体として2%システイン-HC1を含む生理食塩水を用いた。担体中の有効成分の濃度は、ヒトPTHrP(1-

\*34)が $10.4 \mu\text{M}$ 、式[I]のポリペプチドが $20.8 \mu\text{M}$ であり、1日当たり $24 \mu\text{l}$ 投与した。また、対照として、ヒトPTHrP(1-34)のみを上記担体中に含むものを投与した。投与開始前及び投与開始3日後に血清中のカルシウム濃度を測定した。結果を図3に示す。

【0036】図2から明らかなように、本発明のポリペプチドを投与した群では、対照群に比べて血清中のカルシウム濃度が有意に低く、本発明のポリペプチドの生体内におけるPTHrPアンタゴニスト活性が確認された。

【0037】

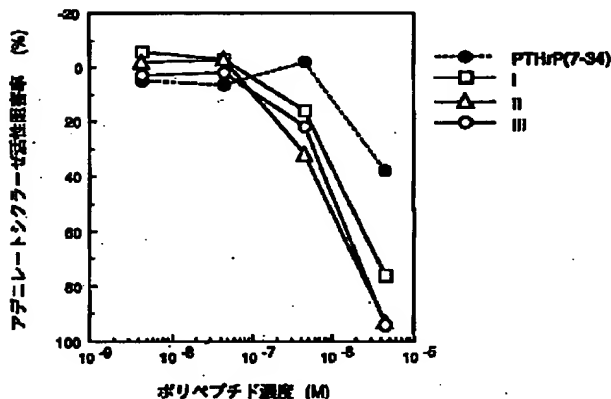
【発明の効果】本発明により、公知のものよりも優れたヒトPTHrPアンタゴニスト活性を有する新規なポリペプチド及びそれを有効成分として含有するカルシウム代謝治療薬が提供された。従って、本発明により、カルシウム代謝に異常のある種々の疾病、例えば高カルシウム血症、骨粗鬆症のような骨疾患及び慢性腎不全による高カルシウム血症の治療がより有効に行えるようになる。

【図面の簡単な説明】

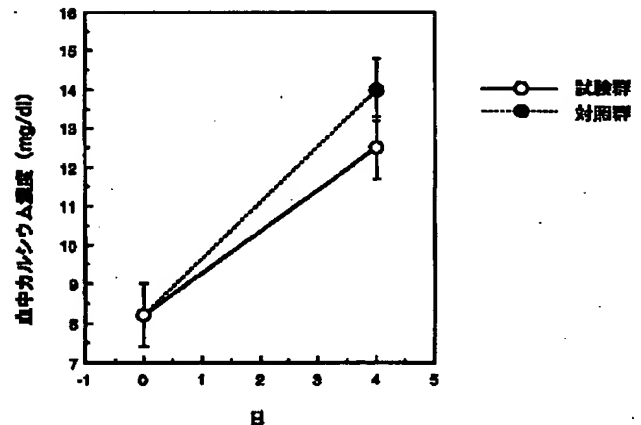
【図1】 本発明の実施例のポリペプチドのアデニレートシクラーゼ阻害活性を、ヒトPTHrP(7-34)と比較して示す図である。

【図2】 ヒトPTHrP(1-34)で誘起した高カルシウム血症マウスにおける本発明のポリペプチドによる血清カルシウム濃度低下効果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 大植 千春

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1-3-1  
東燃株式会社総合研究所内

※(72)発明者 松崎 淳一

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1-3-1  
東燃株式会社総合研究所内

※